

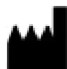
CoproStrip™ C. difficile GDH + Toxina A + Toxina B

Um teste rápido e de um passo para a detecção qualitativa simultânea de *Clostridium difficile* Glutamato Desidrogenase, antigénios de Toxina A e Toxina B em fezes humanas.

Manual de Instruções

Kit de teste para 20 determinações (Catálogo Nº 41220)

Apenas para uso profissional e diagnóstico in vitro
Armazenar a 2-30°C. **Não Congelar**



Savyon® Diagnostics Ltda.
3 Habosem St. Ashdod
77610 ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com

Uso pretendido: O CoproStrip™ C. difficile GDH + Toxina A + Toxina B é um imunoensaio cromatográfico rápido combinado para a detecção simultânea e qualitativa de *Clostridium difficile* Glutamato Desidrogenase (GDH), Toxina A e Toxina B em fezes humanas. Este teste ajuda no diagnóstico de uma infecção por *C.difficile*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO:

O bacilo Gram-positivo anaeróbio *Clostridium difficile* é o agente etiológico líder de diarreia associada a antibiótico e colite pseudomembranosa (1). Este agente patogénico é capaz de causar uma doença grave ou fatal caso não seja diagnosticado e tratado a tempo. A exposição a antibióticos é o fator de maior risco para uma infecção por *C. difficile*. Pode desenvolver-se uma infecção caso a flora gastrointestinal normal for perturbada por terapia com antibiótico e se a pessoa for infectada por *C. difficile* produtora de toxinas, tipicamente através da via fecal-oral (2). Os fatores chave da virulência de *C. difficile* são a toxina A e a toxina B (3, 4). Estas toxinas demonstram uma alta homologia funcional e de sequências. A Toxina A foi descrita como uma enterotoxina que causa danos nos tecidos, atraindo neutrófilos, monofilos e toxina B, sendo esta última uma citotoxina potente que degrada as células epiteliais da mucosa cólica (5). A maior parte das estirpes virulentas produz ambas as toxinas, contudo, as estirpes negativas a toxina A/positivas a toxina B também são capazes de causar doença (6, 7). A *Clostridium difficile* Glutamato Desidrogenase (GDH) é uma enzima produzida em grandes quantidades por todas as estirpes toxigénicas e não-toxigénicas, tornando-a num excelente marcador para este organismo (8, 9).

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O CoproStrip™ C. difficile GDH + Toxina A + Toxina B é um imunoensaio qualitativo para a detecção de *Clostridium difficile* Glutamato Desidrogenase (GDH), Toxina A e Toxina B em amostras de fezes humanas.

A membrana do Teste A está pré-revestida com anticorpos monoclonais contra o antigénio de *Clostridium difficile* (GDH), e a membrana do Teste B está pré-revestida com anticorpos monoclonais contra antigénios de Toxina A de *Clostridium difficile* e a membrana do Teste C está pré-revestida com anticorpos monoclonais contra os antigénios de Toxina B de *Clostridium difficile* na região de linhas de teste. Durante o teste, a amostra reage com as partículas de cor vermelha revestidas com anticorpos anti-GDH no Teste A e/ou com anticorpos anti-Toxina A no Teste B e/ou com anticorpos anti-Toxina B no Teste C, as quais foram pré secas nas tiras de teste. A mistura desloca-se para cima da membrana, via acção capilar. Em caso de um resultado positivo no Teste A, os anticorpos específicos presentes na membrana vão reagir com o conjugado da mistura e gerar uma linha de cor vermelha. Em caso de um resultado positivo no Teste B, os anticorpos específicos presentes na membrana vão reagir com o conjugado de mistura e gerar uma linha de cor vermelha. Em caso de um resultado positivo no Teste C, os anticorpos específicos presentes na membrana vão reagir com o conjugado de mistura e gerar uma linha de cor vermelha. A mistura continua a deslocar-se ao longo da membrana para os locais de anticorpos imobilizados na região da banda de controlo. Aparece sempre uma banda de cor verde nas linhas de controlo, a qual serve de verificação de foi adicionado um volume suficiente, do facto de se ter obtido um bom fluxo e serve também de um controlo interno para os reagentes.

MATERIAIS FORNECIDOS

- Dispositivos CoproStrip™ C. difficile GDH+ Toxina A+ Toxina B
- Instruções de utilização
- Tubo de recolha de amostra com tampão

MATERIAIS NÃO FORNECIDOS

- Recipiente para recolha de amostra
- Luvas descartáveis
- Temporizador

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Apenas para uso profissional e diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar após a data de validade.
- Este teste deve permanecer na bolsa selada até ser utilizado.
- Não utilizar o teste caso a bolsa esteja danificada.
- Sigas as Boas Práticas Laboratoriais, utilize roupa protectora e luvas descartáveis. Não coma, beba ou fumo na área de trabalho.
- Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente nocivas e manipuladas como se fossem agentes infecciosos.
- Este teste deve ser descartado num recipiente de risco biológico após o teste.
- O teste deve ser realizado dentro de 2 horas após abrir a bolsa de alumínio selada.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Armazenar embalado na bolsa selada ao refrigerar ou á temperatura ambiente (2-30ºC). Este teste é estável até à data de validade impressa na bolsa selada. O teste deve permanecer na bolsa selada até ser utilizado. Não congelar.

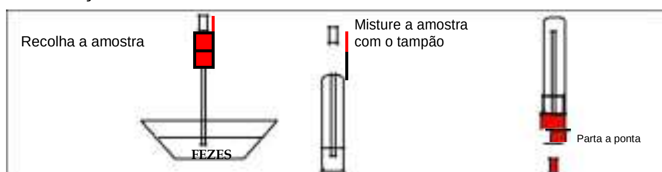
RECOLHE A PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Recolha uma quantidade suficiente de fezes (1-2 g ou ml para a amostra líquida). As amostras de fezes devem ser recolhidas em recipientes limpos e secos (sem conservantes ou meio de transporte). As amostras podem ser armazenadas no frigorífico (2-8ºC) durante 24 horas antes de fazer o teste. Para um armazenamento prolongado, a amostra deve ser congelada a -20ºC. Neste último caso, a amostra deve ser completamente descongelada e estar à temperatura ambiente antes de fazer o teste.

Processamento das amostras de fezes recolhidas (ver ilustração 1):

Utilize um tubo de recolha de amostra individual para cada amostra. Destape o tubo e introduza o palito na amostra fecal e obtenha a amostra (aproximadamente 125 mg). Tape o tubo com o tampão e a amostra de fezes. Homogeneizar o conteúdo do tubo no vórtex durante 15 segundos, no sentido de garantir uma boa dispersão da amostra. Para amostras de fezes líquidas, aspire a amostra fecal com um conta-gotas e adicione 125 µl num tubo de recolha de amostra com tampão.

Ilustração 1



PROCEDIMENTO

Os testes, as amostras de fezes e o tampão devem estar à temperatura ambiente (15-30ºC) antes de fazer o teste. Não deve abrir as bolsas até ter tudo pronto para realizar o ensaio.

1. Retire o Dispositivo da bolsa selada e utilize o mais rapidamente possível.
2. Agite o tubo de recolha de amostra para garantir uma boa dispersão da amostra. Parta a ponta do tubo.
3. Utilize um dispositivo separado para cada amostra. Deite exactamente 4 gotas ou 100 µl para cada um dos poços de amostra (ou seja, no poço GDH, no poço de Toxina A e no poço de Toxina B, marcada como S). Inicie o temporizador.
4. Leia os resultados **10 minutos** depois de ter deitado a amostra.

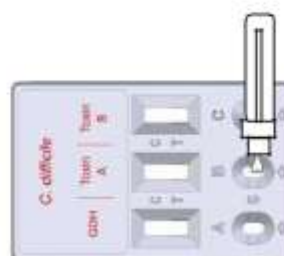
Caso o teste não corra devido a partículas sólidas, misture a amostra adicionada no poço de amostra (S) com o palito. Se continuar a não funcionar, deite umas gota de diluente até ver o líquido percorrer a zona de reacção.

Ilustração 2

Adicione 4 gotas da mistura diluída a cada poço circular



Teste GDH- poço A



Teste de Toxina A- poço B



Teste de Toxina B - poço C

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Nota: A intensidade da linha teste, poderá variar entre as diferentes tiras teste. O surgimento de qualquer intensidade da linha vermelha, indica um resultado positivo

Ilustração 3

	Resultado Indicado	Interpretação
1.	A C B C C	Negativo a GDH, Toxina A e Toxina B. Sem infecção por *C. difficile*.
2.	A C B C C	Positivo a GDH. Negativo a Toxina A e Toxina B. *Indicativo de uma infecção por C. difficile*.
3.	A C B C C	Positivo a GDH e a Toxina A. Negativo a Toxina B. *Indicativo de uma infecção por C. difficile. Recomenda-se aprofundar a análise desta amostra via um outro ensaio reconhecido por CE/FDA.*
4.	A C B C C	Positivo a GDH e Toxina B. Negativo a Toxina A. *Infecção por C. difficile*. *Indicativo de uma infecção por C. difficile*.
5.	A C B C C	Positivo a GDH, Toxina A e Toxina B. *Indicativo de uma infecção por C. difficile*.
6.	A C B C C	Negativo a GDH e Toxina B. Positivo a Toxina A. Repita o teste com o uso de uma amostra nova. Caso o resultado for novamente positivo para Toxina A e negativo para GDH, recomenda-se aprofundar a análise desta amostra via um outro ensaio reconhecido por CE/FDA.
7.	A C B C C	Negativo a GDH e Toxina A. Positivo a Toxina B. Repita o teste com uma amostra nova. Caso o resultado for novamente positivo para Toxina B e negativo para GDH, recomenda-se aprofundar a análise desta amostra via um outro ensaio reconhecido por CE/FDA.
8.	A C B C C	Positivo a Toxina A e Toxina B. Negativo a GDH. Repita o teste com uma amostra nova. Caso o resultado for novamente positivo para Toxina B e negativo para GDH, recomenda-se aprofundar a análise desta amostra via um outro ensaio reconhecido por CE/FDA
9.	Qualquer outro resultado	Resultado inválido: quer A, B ou C, repita o teste com uma nova amostra. Caso obtenha o mesmo resultado, recomenda-se aprofundar a análise desta amostra via um outro ensaio reconhecido por CE/FDA.

INVÁLIDO: Total ausência da banda de controlo verde em um, dois ou três testes (A/B/C), independentemente do aparecimento ou não da linha de teste vermelha em um ou ambos os testes (A/B/C). Observações: volume de amostra insuficiente, técnicas de procedimento incorrectas ou deterioração dos reagentes são geralmente as principais razões para a falha das linhas de controlo. Reveja o procedimento e repita o ensaio com um teste novo. Caso os sintomas ou a situação persistir, descontinue o uso do kit de teste e contacte o seu distribuidor local. Veja a ilustração 3 acima.

NOTAS PARA A INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A intensidade da banda de cor vermelha na região de linha de resultado (T) vai variar dependendo da concentração de antigénios na amostra. Contudo, não é possível determinar o valor quantitativo, nem a taxa de aumento de antigénios com este teste qualitativo.

CONTROLO DE QUALIDADE

Encontram-se incluídos controlos internos de procedimento neste teste em forma de linhas verdes que aparecem na região de linha de controlo (C). Isto confirma a adição de volume suficiente de amostra e uma técnica de procedimento correcta.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. O teste de CoproStrip™ C. difficile GDH + Toxina A + Toxina B apenas vai indicar a presença de GDH, Toxina A e/ou B na amostra (detecção qualitativa). Não é possível determinar nem o valor quantitativo nem a taxa de aumento da concentração de antigénios com este teste.
2. Um excesso de amostra pode causar resultados incorrectos (aparecem bandas castanhas). Em tal caso, dilua a amostra com tampão e repita o teste.
3. Algumas amostras de fezes podem reduzir a intensidade das bandas controlo.
4. Este teste deve ser realizado dentro de 2 hora após a abertura da bolsa de alumínio selada.
5. Caso o resultado do teste for negativo e os sintomas clínicos persistirem, recomenda-se realizar testes adicionais com o uso de outros métodos clínicos. Um resultado negativo nunca exclui a possibilidade de uma infecção causada por *Clostridium difficile*.
6. Este teste fornece um diagnóstico preliminar da infecção causada por *Clostridium difficile*. Todos os resultados devem ser interpretados juntamente com outra informação clínica e resultados laboratoriais que o médico disponha, e devem ser com exames laboratoriais adicionais.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Um estudo que fez uso de amostras de fezes de pacientes com diarreia obteve os seguintes resultados: Os resultados de sensibilidade e especificidade com o uso do teste CoproStrip™ *C.difficile* GDH + Toxina A + Toxina B em comparação com outros testes de imunoensaio comerciais (IC teste: *C. DIFF QUIK CHEK Complete*® TechLab) foram:
Sensibilidade >99% e especificidade >99%.

REACTIVIDADE CRUZADA

Foi feita uma avaliação para determinar a reactividade cruzada do Dispositivo CoproStrip™ C. difficile GDH+Toxina A + Toxina B. Não se observou reactividade cruzada com microrganismos gastrointestinais comuns e ocasionalmente presentes em fezes.

- *Campylobacter spp*
- *E. coli O157:H7*
- *Listeria monocytogenes*
- *Helicobacter pylori*
- *Shigella spp.*
- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella spp*
- *Yersinia spp*
- *Yersinia enterocolitica*

BIBLIOGRAFIA

1. Cloud J, Kelly CP. Update on *Clostridium difficile* associated disease. Curr Opin Gastroenterol. 2007 Jan;23(1):4-9.
2. Owens RC Jr, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG. Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection.Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46 Suppl 1:S19-31.
3. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile colitis.* N Engl J Med. 1994 Jan 27;330(4):257-62
4. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):247-63.
5. Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'brien M, Anton PM, Pothoulakis C. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology. 2003 Aug;125(2):413-20.
6. Pituch H, van den Braak N, van Leeuwen W, van Belkum A, Martirosian G, Obuch-Woszczatyński P, Łuczak M, Meisel-Mikołajczyk F. Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. Clin Microbiol Infect. 2001 Aug;7(8):442-6.
7. Shin BM, Kuak EY, Yoo SJ, Shin WC, Yoo HM., Emerging toxin A-B+ variant strain of *Clostridium difficile* responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Apr;60(4):333-7.
8. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD. Identification of the latex test-reactive protein of Clostridium difficile as glutamate dehydrogenase. J Clin Microbiol. 1991 Nov;29(11):2639-42.
9. Carman RJ, Wickham KN, Chen L, Lawrence AM, Boone JH, Wilkins TD, Kerkering TM, Lyerly DM. Glutamate dehydrogenase is highly conserved among Clostridium difficile ribotypes. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1425-6.



Savyon® Diagnostics Ltda.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Fax : +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com



Representante Autorizado na Europa: Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030
Bruxelas Tel.: +32.2.732.59.54 Fax:
+32.2.732.60.03 E-mail:mail@obelis.net

Símbolos para componentes IVD e Reagentes			
	Fabricante	IVD	Apenas para diagnóstico in vitro
EC REP	Representante Autorizado		Consulte as instruções de utilização
Σ n	Contém o suficiente para <n> testes		Manter seco
REF	Código de Catálogo		Limitação de temperatura
LOT	Número de lote		Prazo de validade
DIL	Diluente de amostra		